

氏名・(本籍)	長谷川 雅 昭 (兵庫県)		
学位の種類	博士 (医学)		
学位記番号	博士 第250号		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
学位授与年月日	平成9年3月24日		
学位論文題目	Dominant negative SHPTP 2 トランスジェニックマウスの作成		
	審査委員	主査 教授	大久保 岩 男
		副査 教授	瀬 戸 昭
		副査 教授	吉 川 隆 一

論文内容の要旨

【目的】

近年、インスリン抵抗性を有する肥満症例や糖尿病モデル動物において種々のチロシンホスファターゼ (PTPase) 活性異常が報告され、同酵素群が糖尿病の発症進展に関わっている可能性が示唆されている。本研究ではPTPaseの一つであるSHPTP 2 の生体内での機能、その機能異常によるインスリン抵抗性への関与を検討するため、変異型SHPTP 2 を過剰発現したトランスジェニック (Tg) マウスを作成した。

【方法】

1) 発現ベクターの構築

SHPTP 2 の2つのSH 2 ドメインを含む部位、648bpのcDNA (アミノ酸番号1-216) の上流にcytomegalovirus IEエンハンサーおよびchicken β actinプロモーターを、またその下流にpolyAシグナルを接続した全長約3.1kbpの発現ベクターを構築した。

2) Tgマウスの作成

マイクロインジェクション法にて受精卵への発現ベクターの注入を行い、既報の方法に従いTgマウスの作成を行った。

3) 導入遺伝子の検定

仔マウス尾よりDNAを抽出し、発現ベクターDNAをプローブに用いサザンブロット法を行い導入遺伝子の有無を確認した。

4) 各種臓器への導入遺伝子産物発現の検討

2系統の雄トランスジェニックマウス (S 6、S 161) についてF₁マウスを作成し各臓器への変異蛋白の発現を、抗SHPTP 2抗体 (抗PTP 1 D抗体) を用いたウェスタンブロット法にて検討した。

5) 血糖値及び血清インスリン値の測定

早朝摂餌中止4時間後の血糖値をグルコースオキシダーゼ法により、また血清インスリン値の測定はELISA法によるラットインスリン測定キットを用いて測定した。

6) インスリン負荷試験

早朝6時間絶食後、ペントバルビタール麻酔下に腹腔内に0.75U/kg速効型ヒトインスリンを投与し、投与後0、30、60分後の血糖値を測定し、インスリン抵抗性の有無を検討した。

7) インスリン負荷によるSHPTP 2 のIRS-1への結合の検討

下大静脈よりヒトインスリン5単位を静注90秒後のマウス肝臓におけるSHPTP 2 のIRS-1への結合をウェスタンブロット法にて検出した。

【結果】

- 1) Tgマウス群、対照群間で成長曲線の差異および外表上の明らかな奇形は認められなかった。
- 2) 骨格筋、肝臓、脂肪組織などのインスリン感受性組織を含む検討しえた全組織で導入遺伝子の蛋白質レベルでの発現が確認された。特に骨格筋における変異型SHPTP 2 発現量はマウス内

因性SHPTP 2 の約10倍であった。

- 3) 早朝食餌中止 4 時間後の血糖値に両群間での差異は認められなかった。しかし、血清インスリン値は S 6 系統においては Tg マウス群で対照群の 3.4 倍高値、また S 161 系統においても対照群の 2.3 倍の高値であった。
- 4) インスリン負荷試験で Tg マウス群 (S 6) において血糖降下率の低下傾向が認められたが、対照群に比し統計学的な有意には至らなかった。
- 5) インスリン負荷前では IRS-1 と SHPTP 2 のわずかな結合が認められ、その量は両群間で同程度であった。しかしインスリン負荷により SHPTP 2 の IRS-1 への結合は対照群では負荷前の 4 倍に増加が Tg マウス群では 1.6 倍の増加であり、インスリン刺激下にみられる SHPTP 2 の IRS-1 への結合は変異型 SHPTP 2 発現により抑制された。

【考 察】

Tg マウスを用いる方法は導入遺伝子の発現による種々の物質の個体全体の生理機能に与える効果を知ることができるのみならず、個体発生を通して正常の発生分化過程での導入遺伝子の機能を解析することができる。現在までのところ生体内での糖代謝調節における SHPTP 2 の役割については十分理解されていない。本研究において検討した S 6、S 161 系統の dominant negative Tg マウスは外表上正常な個体が誕生し、またその成長曲線も対照マウスと差異がなかった。さらに、4 時間絶食後の血糖値も両群間に有意差がなかった。しかし、Tg マウス血清インスリン値は S 6 系統では対照群の 3.4 倍、また S 161 系統では 2.3 倍高値であった。すなわち、Tg マウスにおいてインスリン抵抗性の存在が強く示唆され、SHPTP 2 が生体内の糖代謝調節機構において重要な役割を担っている可能性が示唆された。インスリン負荷試験で Tg マウス群と対照群間に血糖降下曲線に有意差は認められなかったが、さらに高感度インスリン抵抗性測定法での再検討が必要と思われた。

【結 論】

SHPTP 2 機能異常をきたすと考えられる Tg マウスにおいてインスリン抵抗性が存在したことから、SHPTP 2 が生体内の糖代謝調節機構において重要な役割を担っている可能性が示唆された。また、我々の作成した Tg マウスは *in vivo* でのインスリン抵抗性を研究する上で新たなモデル動物になると考えられる。

論文審査の結果の要旨

インスリン抵抗性を有する患者や糖尿病モデル動物で、種々のチロシンホスファターゼ (PTPase) 活性の異常が報告され、同酵素が糖尿病の発症と進展に関わっている可能性が示唆されている。本研究は PTPase の一つである SHPTP 2 のインスリン抵抗性発現における意義を明らかにするため、PTPase ドメインを欠失した変異型 SHPTP 2 を過剰発現するトランスジェニックマウスを作成し、本来の SHPTP 2 の機能を障害することにより、インスリン抵抗性が発症するか否かを検討したものである。

本論文では以下の点が明らかにされた。

- 1) 変異型 SHPTP 2 を、骨格筋、肝臓、脂肪組織などインスリン感受性組織を含む各組織に過剰発現したトランスジェニックマウス作成に成功した。
- 2) 同トランスジェニックマウスは耐糖能障害を呈し、高インスリン血症を有することより、インスリン感受性の低下が示唆された。

以上の結果より、SHPTP 2 がインスリンによる生体内の糖代謝調節において情報伝達に関するタンパク質として重要な役割を担っていることが示唆された。また同マウスは *in vivo* でのインスリン抵抗性を研究する上で新たなモデル動物になると考えられた。

本論文は、インスリン抵抗性発症機構において、SHPTP 2 が重要な役割を果たしていることを明らかにし、さらに糖尿病発症機構解析に新しい方向性を示したものであり、博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。